



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE QUÍMICA

EFECTO DEL ANTIOXIDANTE DIETARIO  $\alpha$ -  
MANGOSTINA SOBRE EL DAÑO PRODUCIDO POR  
LA INHIBICIÓN METABÓLICA EN CULTIVOS  
PRIMARIOS DE NEURONAS GRANULARES DE  
CEREBELO DE RATA.

T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

P R E S E N T A:

**Marisol Hernández Nava**

DIRECTOR DE TESIS:  
DR. JOSÉ PEDRAZA CHAVERRI.



México, D.F.

2011



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**Jurado Asignado:**

PRESIDENTE: Profesor: José Pedraza Chaverri  
VOCAL: Profesor: Perla Carolina Castañeda López  
SECRETARIO: Profesor: María Del Socorro Cecilia Reyna Rodríguez  
1er SUPLENTE: Profesor: María Elena Bravo Gómez  
2do SUPLENTE: Profesor: Perla Deyanira Maldonado Jiménez

**Sitio donde se desarrollo el tema**

Laboratorio 209, segundo piso, edificio F, Facultad de Química UNAM.  
Esta tesis fue apoyada por los proyectos DGAPA PAPIIT IN201910 Y CONACYT 129838

**ASESOR**

---

Dr. José Pedraza Chaverri

**SUSTENTANTE**

---

Marisol Hernández Nava

## Abreviaturas

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNasa I	Desoxiribonucleasa tipo I
ATP	Adenosin trifosfato
BHA	Hidroxibutilanisol
BHT	Butil hidroxitolueno
Carboxi-DCF	5-(6-)carboxi-2,7-diclorofluoresceina
Carboxi-H <sub>2</sub> DCFDA	5-(y 6-) carboxi-2,7-diclorodihidrofluoresceina diacetato
DHE	Dihidroetidio
DIV	Días in Vitro
DMSO	Dimetil sulfóxido
ERN	Especies reactivas de nitrógeno
ERO	Especies reactivas de oxígeno
Et	Etidio
GM	Garcinia mangostana
GAPDH	Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa
HL60	Línea celular de leucemia humana
IAA	Iodoacetato
CI <sub>50</sub>	Concentración inhibitoria 50
LDL	Lipoproteínas de baja densidad
LLC-PK1	Línea celular del túbulo proximal renal
MBE	Medio basal Tagle
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5-difeniltetrazolio
NGC	Neuronas granulares de cerebelo
SFB	Suero fetal bovino

## Contenido

1. Introducción .....	1
1.1 Estrés oxidante y radicales libres .....	1
1.2 Especies reactivas de oxígeno .....	1
1.3 Defensa antioxidante.....	2
1.4 Garcinia mangostana .....	3
1.5 Iodoacetato.....	5
2. Objetivos .....	8
2.1 General.....	8
2.2 Particulares .....	8
3. Hipótesis .....	8
4. Materiales y métodos.....	9
4.1 Reactivos.....	9
4.2 Aislamiento de la $\alpha$ -mangostina .....	9
4.3 Preparación de los cultivos primarios de NGC de rata.....	9
4.4 Preincubación con $\alpha$ -mangostina .....	10
4.5 Tratamiento de NGC con IAA.....	10
4.6 Determinación de la viabilidad celular por el método de MTT .....	11
4.7 Determinación de la producción de ERO. ....	12
5. Resultados y Discusión.....	13
5.1 Aislamiento de $\alpha$ -mangostina .....	13
5.2 Viabilidad celular .....	14
5.3 Evaluación de la producción de ERO.....	15
6. Conclusión .....	18
7. Referencias.....	18

## Resumen

**ANTECEDENTES:** El iodoacetato (IAA) es un inhibidor de la enzima glucolítica gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GADPH). En neuronas granulares de cerebelo de rata (NGC) esta inhibición provoca la disminución de ATP, aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) y estrés oxidante. Por otro lado, la cáscara de la fruta del mangostán (*Garcinia mangostana* Linn) (GM), árbol tropical de origen asiático, se ha usado durante siglos en la medicina tradicional para el tratamiento de infecciones de la piel, disentería y diarrea. Se ha informado ampliamente que su efecto medicinal se debe principalmente a los metabolitos secundarios presentes en la especie llamados xantonas. Por otra parte, se ha descrito en diversos modelos experimentales *in vivo* e *in vitro* que la  $\alpha$ -mangostina, la xantona más abundante de GM, posee capacidad antioxidante.

**HIPÓTESIS:** La  $\alpha$ -mangostina podría atenuar la producción de ERO y la muerte celular inducidas por IAA en cultivos primarios de NGC de rata.

**OBJETIVOS:** Aislar y purificar la  $\alpha$ -mangostina del polvo de la cáscara del mangostán y evaluar su efecto sobre la producción de ERO y la muerte celular inducidas por IAA en cultivos primarios de NGC de rata.

**MÉTODOS:** Se utilizaron cultivos primarios de NGC de ratas de 7 días de nacidas. A los 9 días de cultivo *in vitro*, las NGC se preincubaron por 16 h usando tres concentraciones de  $\alpha$ -mangostina: 8, 12 y 14  $\mu$ M. Transcurridas las 16 h se retiró la  $\alpha$ -mangostina y se agregó por 30 min IAA (18  $\mu$ M). La producción de ERO y la viabilidad celular se midieron a las 4 y 24 h, respectivamente después de la adición de IAA. La viabilidad celular se midió por el método de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) y la producción de ERO se midió usando marcadores fluorescentes, dihidroetidio (DHE) y 5-(y 6-) carboxi-2,7-diclorodihidrofluoresceina diacetato (carboxi-H<sub>2</sub>DCFDA).

**RESULTADOS:** La  $\alpha$ -mangostina atenúa la muerte celular en la NGC y la producción de ERO inducidas con IAA de manera dependiente de la concentración.

**CONCLUSIÓN:** La neuroprotección por  $\alpha$ -mangostina de la muerte celular inducida por IAA en las NGC se asocia a la disminución de la producción de ERO.

# 1. Introducción

## 1.1 Estrés oxidante y radicales libres

En organismos saludables, la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) y especies reactivas de nitrógeno (ERN) están balanceadas con el sistema de defensa antioxidante. Este equilibrio no siempre es perfecto, por lo que ocurren continuamente daños a moléculas que deben ser reparadas como el ADN o ser reemplazadas como las proteínas oxidadas (Halliwell y Gutteridge, 2001). Además el estrés oxidante juega un papel importante en enfermedades cardiovasculares y otros daños crónicos (Mahabusarakam et al., 2000)

Las especies reactivas incluyendo a los radicales libres, participan en numerosas reacciones enzimáticas y no enzimáticas dentro de la célula, por ejemplo, se forman como intermediarios en reacciones de óxido-reducción, son importantes en el combate contra microorganismos invasores; en la comunicación intracelular actúan como segundos mensajeros, etc. (Olinescu y Smith, 2002). Los radicales libres son capaces de existir de manera independiente y poseen uno o más electrones desapareados (Halliwell y Gutteridge, 2001), llegan a tener carga eléctrica variable y poseen una alta reactividad química (Olinescu y Smith, 2002).

El estrés oxidante se define como un desbalance entre la producción ERO/ERN y la defensa antioxidante o también es conocido como una alteración entre prooxidantes-antioxidantes a favor de la formación de ERO/ERN que provoca daño, en ambos casos puede deberse a una disminución en la defensa antioxidante o a un incremento en la producción de ERO/ERN (Halliwell y Gutteridge, 2001).

## 1.2 Especies reactivas de oxígeno

El oxígeno existe en el aire como una molécula diatómica ( $O_2$ ) que se encuentra en un 99% en la atmósfera (Halliwell y Gutteridge, 2001).

Las principales ERO pueden clasificarse en dos grupos:

1. Radicales que tienen oxígeno con un electrón desapareado:



2. Productos que contienen oxígeno molecular:

**Peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), ROOR, ROOH, oxígeno singulete (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>), epóxidos, endoperóxidos y 1,2- dioxetanos**

Algunos de estos productos son convertidos mediante la reacción de Fenton a moléculas altamente reactivas como el radical hidroxilo y alcoxi.

Las ERO más importantes son:

- 1) O<sub>2</sub><sup>•-</sup> Radical anión superóxido y su ácido conjugado HO<sub>2</sub><sup>•</sup>
- 2) OH<sup>•</sup> Radical hidroxilo.
- 3) ROO<sup>•</sup> Radicales peroxilos formados por autoxidación.
- 4) RO<sup>•</sup> Radical alcoxi formado por la descomposición de alquilhidroperóxidos ya sea térmicamente o vía transferencia de un electrón por un ion metálico.
- 5) NO<sup>•</sup> Óxido nítrico (Eberhardt, 2001).

### **1.3 Defensa antioxidante**

Los antioxidantes son esenciales para contrarrestar el daño producto del estrés oxidante, como la lipoperoxidación (Halliwell y Gutteridge, 1990).

En el campo científico se ha definido a un antioxidante como cualquier sustancia que retrase, prevenga o remueva el daño oxidante a una molécula blanco (Halliwell y Gutteridge, 2007).

La defensa antioxidante consiste en compuestos que se encuentran de forma natural como el ácido úrico, α-tocoferol (Vitamina E), bilirrubina, glutatión. (Halliwell y Gutteridge, 1990), o como suplementos en la dieta como la vitamina A y C (Eberhardt, 2001).

La defensa antioxidante comprende:

- a) Agentes que remueven radicales libres y otras especies reactivas.
- b) Iones hierro, iones cobre y grupo hemo (transferrina, haptoglobina, hemopexina y metalotioneína) que reducen al mínimo pro-oxidantes.
- c) Proteínas que protegen biomoléculas contra daño por otros mecanismos por ejemplo, proteínas de choque térmico.



- d) Agentes de bajo peso molecular que atrapan ERO/ERN (glutación,  $\alpha$ -tocoferol y ácido úrico), o bien algunos antioxidantes que se obtienen de la dieta (Halliwell y Gutteridge, 2001).

Otra clasificación es la que se presenta en la Figura 1.

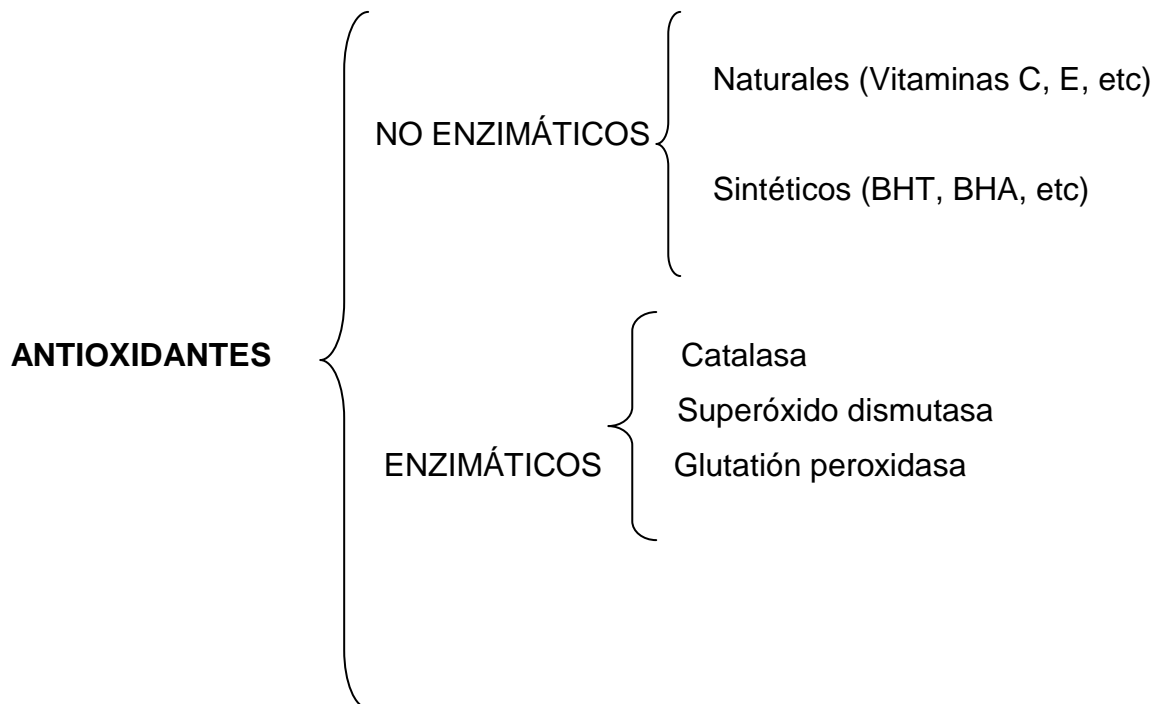


Figura 1. Clasificación de los antioxidantes. BHT=butil hidroxitolueno BHA=hidroxibutilanisol (Olinescu y Smith, 2002).

### **1.4 *Garcinia mangostana***

*Garcinia mangostana* Linn (GM), es un árbol que se encuentra al sureste de Asia donde es conocido como mangostán, crece lentamente hasta alcanzar una altura de 6-25 metros, tiene frutos redondos de color púrpura oscuro y con cáscara (pericarpio) de 7 mm de espesor. La parte comestible del fruto es blanca y jugosa con un sabor ligeramente ácido y dulce, de agradable aroma y dividida en 5 u 8 segmentos (Jung et al., 2006; Marcason, 2006).

El GM se distribuye principalmente en Indonesia, Malasia, Sri Lanka, Myanmar, Filipinas y Tailandia donde se conoce como “la reina de las frutas” (Sukit et al., 2009); en estas regiones los habitantes han utilizado el pericarpio como parte de la medicina tradicional para tratar heridas e infecciones de la piel (Mahabusarakam et al., 1987; Pierce, 2003),

disentería amebiana (Garnett y Sturton, 1932; Chopra et al., 1956; Sen et al., 1980), cólera, infecciones bacterianas (Moongkarndi et al., 2004), inflamación crónica y diarrea (Balasubramanian y Rajagopalan, 1988). Se ha demostrado que la fruta contiene una variedad de metabolitos secundarios tales como xantonas oxigenadas y preniladas (Gopalakrishnan et al., 1980; Peres et al., 2000). Estas xantonas se encuentran en algunas familias de plantas superiores, en hongos y en líquenes (Vieira y Kijjoa, 2005). La estructura base de las xantonas se conoce como 9-xantenona o dibenzo gamma pirona (Figura 2), es un compuesto simétrico y puede sustituirse en diferentes posiciones lo que da lugar a una gran variedad de estructuras químicas con actividades farmacológicas y biológicas (Pinto et al., 2005).

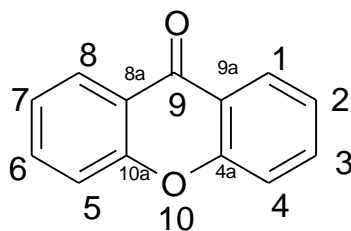


Figura 2. Estructura general de las xantonas.

La xantona presente en mayor concentración en GM es la  $\alpha$ -mangostina (Figura 3) la cual se aisló del pericarpio de la fruta por primera vez en 1855. En diversos estudios se ha demostrado que la  $\alpha$ -mangostina presenta actividades biológicas muy importantes entre las que se encuentran: propiedades antiinflamatorias (Shankaranarayan et al., 1979), antibacterianas (Linuma et al., 1996; Suksamrarn et al., 2003), fungicidas (Gopalakrishnan et al., 1997) y antitumorales (Matsumoto et al., 2003).

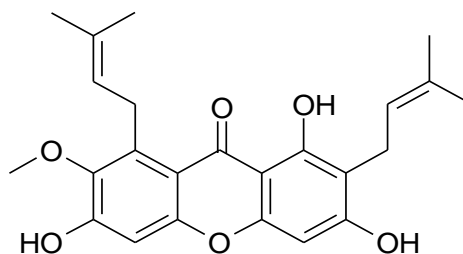


Figura 3 Estructura de la  $\alpha$ -mangostina

Fan y Su en 1997 caracterizaron las propiedades antioxidantes de las  $\alpha$  y  $\gamma$ -mangostinas obtenidas del extracto metanólico de la fruta de GM y la compararon con la actividad

antioxidante de otros compuestos de referencia. Williams y colaboradores en 1995 encontraron que la  $\alpha$ -mangostina disminuye la oxidación, inducida por cobre o por radical peroxilo, de las lipoproteínas de baja densidad (LDL). Por otro lado, Jung y colaboradores en 2006 midieron la capacidad atrapadora de peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ) de 14 xantonas aisladas del pericarpio de GM mediante la oxidación de dihidrorodamina 123 y encontraron que la  $\alpha$ -mangostina presenta actividad antioxidante con una  $\text{CI}_{50}=12.2 \mu\text{M}$ . Pedraza-Chaverri y colaboradores (2009) también determinaron que la  $\alpha$ -mangostina tiene la capacidad de atrapar  $^1\text{O}_2$ ,  $\text{O}_2^{\bullet-}$ ,  $\text{ONOO}^-$ , las cuales son de gran importancia ya que son precursores de especies más oxidantes como  $\text{OH}^\bullet$ . Yukihiro y colaboradores (2008) encontraron que la  $\alpha$ -mangostina tiene un efecto preventivo del cáncer y que el extracto del pericarpio constituido principalmente por  $\alpha$ - y  $\gamma$ -mangostina, presentó un incremento de la actividad de las células natural killer (NK) en un modelo murino.

### **1.5 Iodoacetato**

El IAA es un inhibidor irreversible de la glucólisis (Sperling et al., 2003) que reacciona covalentemente con el grupo tiol (-SH) de las enzimas (Uto et al., 1995), actuando principalmente sobre la enzima gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) que cataliza la conversión del gliceraldehído 3-fosfato a 1,3-bifosfoglicerato.

Aunque la glucólisis solo proporciona una pequeña parte de la energía total, es esta ruta la que proporciona intermediarios clave para el ciclo de Krebs (ruta de los ácidos tricarboxílicos) y la fosforilación oxidativa vía la cadena de transporte de electrones. Por esta razón se dice que la glucólisis es una ruta crítica para mantener las funciones metabólicas de las neuronas (Malcolm et al., 2000).

La inhibición glucolítica provocada por el IAA causa una disminución de los niveles de energía (ATP) dependiente de la concentración, lo cual provoca un daño en la viabilidad neuronal (Hernández-Fonseca et al., 2008), además de que produce ERO que se reducen de manera efectiva mediante antioxidantes (Uto et al., 1995; Malcolm et al., 2000; Hernández-Fonseca et al., 2008). Lo anterior sugiere que la producción de ERO está asociada con la inhibición metabólica producida por IAA y que es una de las principales causas por las que se induce la muerte celular.

Por otro lado una inhibición del metabolismo glucolítico puede desestabilizar la homeostasis de calcio debido a las fallas en los mecanismos de entrada y salida de calcio dependiente de ATP, favoreciendo la producción de ERO (Massieu et al., 2003).

## **Justificación**

Se requieren estudios controlados para conocer las bases científicas del uso del mangostán en la medicina tradicional. Estos estudios controlados nos permitirán conocer el mecanismo por medio del cual las moléculas presentes en el mangostán, como la  $\alpha$ -mangostina, pueden ejercer sus efectos benéficos. El estudio del mecanismo de acción de  $\alpha$ -mangostina en neuronas en cultivo se justifica por el hecho de que a largo plazo se podría proponer su uso en el tratamiento de diversos padecimientos neurodegenerativos asociados al daño oxidante (Moreira et al., 2008, Schapira, 2008).

## **2. Objetivos**

### **2.1 General**

Evaluar el efecto de la  $\alpha$ -mangostina sobre el daño neurotóxico y la producción de ERO provocados por IAA en cultivos de NGC de rata.

### **2.2 Particulares**

- A) Aislar y purificar la  $\alpha$ -mangostina del polvo de la cáscara del mangostán.
- B) En NGC tratadas con IAA determinar el efecto de la preincubación por 16 horas de tres concentraciones diferentes de  $\alpha$ -mangostina sobre:
  1. La viabilidad neuronal por el método de MTT.
  2. La producción de ERO usando los marcadores fluorescentes dihidroetidio y carboxi-H<sub>2</sub>DCFDA.

## **3. Hipótesis**

La preincubación con  $\alpha$ -mangostina podría atenuar el daño inducido por IAA en las NGC, debido a su conocida capacidad atrapadora de ERO y su efecto neuroprotector.

## **4. Materiales y métodos**

### **4.1 Reactivos**

La tripsina, la desoxiribonucleasa tipo I (ADNasa I), la citosina-B-D-arabino-furanosida (citosina), la L-glutamina, la glucosa, la gentamicina, el Medio Basal Eagle, el bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT), la poli-L-lisina, el iodoacetato de sodio y el dimetil sulfóxido (DMSO) se adquirieron de Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA). El suero fetal bovino (SFB), el inhibidor de tripsina, la penicilina/estreptomicina y el azul de tripano se adquirieron en Gibco (Gaithersburg, MD, USA). El diacetato de 5-(y 6-)carboxi-2'-7'-diclorodihidrofluoresceína (carboxi-H<sub>2</sub>DCFDA) y el dihidroetidio (DHE), se adquirieron de Invitrogen Molecular Probes (Eugene, OR, EUA). El resto de los reactivos son de grado analítico y se encuentran disponibles comercialmente.

### **4.2 Aislamiento de la $\alpha$ -mangostina**

La extracción y aislamiento de la  $\alpha$ -mangostina se realiza como fue descrito por Márquez-Valadez y colaboradores (2009). Se realiza una extracción de la cáscara seca de GM (1,134 g) por maceración con diclorometano/metanol (1:1) (4 L) a temperatura ambiente durante 3 semanas. Después el solvente se filtra y se evapora a presión reducida en un rotaevaporador para obtener el extracto orgánico, el cual se somete a un fraccionamiento primario en una columna cromatográfica de sílica gel y se eluye con una mezcla hexano/ diclorometano (4:6). Se realizan cromatoplasmas de cada fracción comparándola con una referencia de  $\alpha$ -mangostina pura y una vez obtenida se juntan las fracciones y se realiza la purificación mediante recristalización.

### **4.3 Preparación de los cultivos primarios de NGC de rata.**

Las células NGC se obtiene de cerebelos libres de meninges provenientes de 7 ratas Wistar de 7 días de nacidas (Guzmán-Beltrán et al., 2008), los cuales se limpian y se trituran hasta tener un homogenado. Después se realiza la degradación enzimática con 0.25% de tripsina (37°C, 10 min), se detiene la reacción al adicionar una solución con 0.52% de inhibidor de tripsina y 0.08% de ADNasa I, se pasa por una malla estéril de poliéster para realizar la disgregación mecánica.

Las células se suspenden en 10 mL de medio basal Eagle (MBE), constituido por 2 mM de L-glutamina, 10% de suero fetal bovino inactivado por calor, 90 U/mL penicilina con 90  $\mu$ g/mL estreptomicina, 50  $\mu$ g/mL de gentamicina y 20 mM de KCl. La cuenta de células

vivas se realiza utilizando 10  $\mu\text{L}$  de azul de tripano y 10  $\mu\text{L}$  de suspensión celular empleando la cámara de Neubauer. Al momento de sembrar se colocan  $310\text{-}320 \times 10^3$  células/ $\text{cm}^2$  en cajas de 24 pozos de la marca Costar previamente tratadas con poli-L-lisina (5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Las células se mantienen a  $37^\circ\text{C}$  en una atmósfera húmeda de  $\text{CO}_2$  5% y  $\text{O}_2$  95%, 24 h después se adiciona citosina arabinosa 10  $\mu\text{M}$  para inhibir la proliferación de células no neuronales y 72 h más tarde, se agrega glucosa a una concentración final de 5 mM como fuente de carbono. Con este método se obtiene alrededor de 90% de neuronas (Orozco-Ibarra et al., 2008). Las células se observan en un microscopio Nikon TS100F para verificar el desarrollo de las neuronas y a los 9 días DIV se utilizan las células para los diferentes ensayos.

#### **4.4 Preincubación con $\alpha$ -mangostina**

En estudios previos de nuestro laboratorio se encontró que la  $\alpha$ -mangostina ejerce en la NGC un efecto neuroprotector del daño inducido por ácido 3-nitropropionico. Dicha protección se logró mediante la coincubación de  $\alpha$ -mangostina y del agente neurotóxico y se asoció a la disminución de la producción de ERO. En estudios que actualmente se realizan en nuestro laboratorio se determinó que la preincubación con  $\alpha$ -mangostina también ejerce un efecto protector en la NGC y que la máxima protección se logró a las 16 de preincubación. Basados en estos resultados en este estudio se realizó una preincubación con  $\alpha$ -mangostina durante 16 h.

Una vez transcurridos los 9 DIV en las cajas de 24 pozos, se prepara una solución de  $\alpha$ -mangostina 1.2 mM, DMSO al 10% y amortiguador de fosfatos 10 mM, se preparan soluciones con concentraciones finales de 8, 12 y 14  $\mu\text{M}$  con las cuales las NGC se preincuban durante 16 h para posteriormente adicionar el tóxico.

La concentración más alta utilizada fue la de 14  $\mu\text{M}$  ya que en estudios previos en el laboratorio se ha demostrado que a mayores concentraciones de  $\alpha$ -mangostina (16 y 20  $\mu\text{M}$ ) la viabilidad celular disminuye (Pedraza-Chaverri et al., 2009).

#### **4.5 Tratamiento de NGC con IAA.**

Se utilizan cajas de 24 pozos, 16 h después de adicionar la  $\alpha$ -mangostina se retira el medio y se sustituye con medio Ringer fresco pH 7.4 (Tabla 1).



Tabla 1. Concentraciones de cada solución para la preparación de medio Ringer.

Solución	Concentración (mM)
NaCl	134
CaCl <sub>2</sub>	1.8
KCl	5.6
HEPES	20
NaHCO <sub>3</sub>	3.9
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.2
Glucosa	5.2

El IAA se adiciona a los cultivos por 30 min en una concentración final de 18  $\mu$ M ya que en estudios previos realizados por Cárdenas-Rodríguez y colaboradores (2009) se determinó que este compuesto disminuye la viabilidad celular de manera dependiente de la concentración con una  $CI_{50}=18.4 \mu$ M. Al final de este tiempo se retiró el IAA y se reemplazó con el medio de cultivo. Las células se incubaron por 4 h adicionales para medir la producción de ERO y, en experimentos por separado la incubación se prolongó por 24 h para evaluar la viabilidad celular

#### **4.6 Determinación de la viabilidad celular por el método de MTT**

Este método se utilizó para determinar la cantidad de células vivas después de los tratamientos y se basa en la reducción de la sal de tetrazolio MTT, de color amarillo a formazán, de color violeta (Figura 4) por la presencia de las deshidrogenasas mitocondriales, y por tanto, es un índice de la actividad mitocondrial lo cual se considera un indicador de viabilidad celular (Berridge y Tan, 1993). Después de 24 h del tratamiento de las células con el tóxico, se agrega MTT (1 mg/mL), se incuban durante 1 h a 37°C, se retira el MTT, se disuelve el formazán en isopropanol ácido al 4% y se determina la densidad óptica a 570 nm. Los resultados se expresan como porcentaje de MTT reducido. En todos los casos las determinaciones se hacen por triplicado: de cada concentración de  $\alpha$ -mangostina, de los tratados con IAA, así como del control del cultivo. Los datos se presentan como el promedio de cinco experimentos independientes.



Figura 4. Reducción de MTT por acción de reductasas mitocondriales.

#### **4.7 Determinación de la producción de ERO.**

Después de 4 h del tratamiento de las NGC con IAA se cuantifican las ERO (González-Reyes et al., 2009). Para esto, se retira el medio de cultivo a las neuronas y se lavan con medio Ringer fresco que debe estar a 37°C. Para esta determinación se utilizaron los marcadores fluorescentes DHE y carboxi-H<sub>2</sub>DCFDA (Hernández-Fonseca et al., 2008).

El DHE entra a las células y se oxida principalmente por O<sub>2</sub><sup>•-</sup> a etidio (Et) en el citosol y es retenido en el núcleo de la célula por su interacción con el ADN y así el núcleo se tiñe de color rojo brillante (Bindokas et al., 1996). Por otro lado la carboxi-H<sub>2</sub>DCFDA es deacetilada, oxidada por ERO y ERN para ser convertida a un compuesto fluorescente 5-(6-)carboxi-2,7-diclorofluoresceína (carboxi-DCF), esto ocurre en el citoplasma por lo que se tiñe de color verde brillante (Hernández-Fonseca et al., 2008).

Ambos reactivos deben estar disueltos en Ringer y se dejan durante 20 minutos, pasado el lapso se lavan las células y se observa en un microscopio epifluorescente (excitación a 450-490 nm para carboxi-DCF y excitación a 510-560 nm para Et). Se tomaron fotografías en 5 campos diferentes de cada condición y se realizó la cuantificación de la intensidad de la fluorescencia con un analizador de imágenes NIS elements Nikon.

## 5. Resultados y Discusión

### 5.1 Aislamiento de $\alpha$ -mangostina

El fraccionamiento primario del extracto orgánico obtenido de la cáscara seca de GM, permitió obtener un total de 97 fracciones, de las cuales se evaporó el solvente hasta dejar un volumen de 5 mL que se usó para realizar cromatografía en capa fina (ccf) de cada una de ellas y se compararon con una muestra pura de  $\alpha$ -mangostina para determinar las fracciones en las que se encontraba presente y posteriormente purificarlo. La comparación con la muestra de referencia evidenció la presencia de la  $\alpha$ -mangostina en las fracciones 60-92, la Figura 5A muestra la ccf de la fracción 61 donde se observa la presencia de  $\alpha$ -mangostina acompañada de otros compuestos, en la figura 5B se observa que en la fracción 94 ya no había  $\alpha$ -mangostina por lo que se continuo con la purificación por el método de recristalización obteniéndose un sólido color amarillo que presento un punto de fusión de 178-180°C (Figura 6).

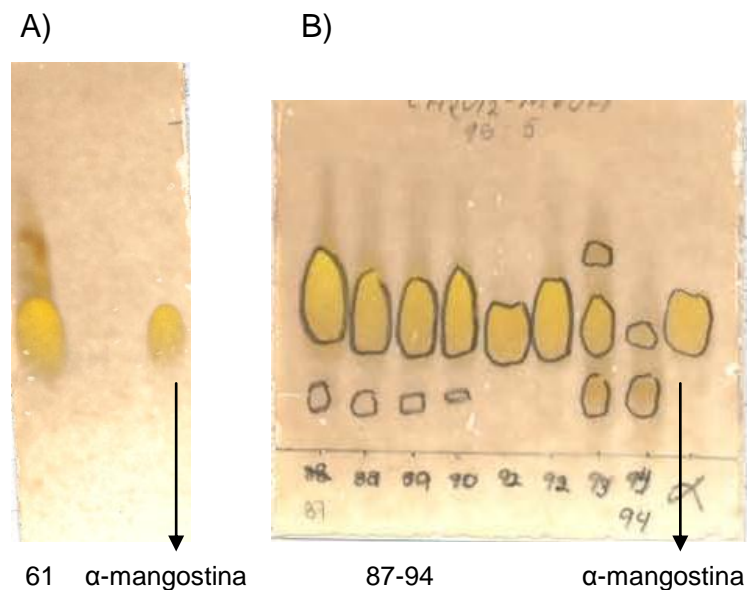


Figura 5. Cromatoplasmas de  $\alpha$ -mangostina. El sistema de elución diclorometano:metanol (95:5)



α-mangostina

Figura 6. Purificación de α-mangostina por recristalización. La purificación se realizó con una mezcla hexano-diclorometano 6:4 y después 7:3

## 5.2 Viabilidad celular

- Efecto de la preincubación de α-mangostina sobre la neurotoxicidad provocada por IAA.

Para evaluar el efecto de la preincubación con α-mangostina durante 16 h sobre la viabilidad de las NGC tratadas con IAA a una concentración de 18 μM (Cárdenas-Rodríguez et al., 2009), se utilizaron tres concentraciones de α-mangostina 8, 12 y 14 μM ya que en estudios anteriores Pedraza-Chaverrí y colaboradores (2008) encontraron que la α-mangostina no afecta la viabilidad celular hasta 14 μM; además se determinó que la concentración de α-mangostina de 10 μM inhibe el crecimiento de células de leucemia humana HL60 por apoptosis (Matsumoto et al., 2003).

La α-mangostina es un antioxidante que atrapa algunas ERO directamente (Pedraza-Chaverrí et al., 2008; Márquez-Valadez et al., 2009) y por otro lado, se sabe que el IAA produce isquemia e hipoglucemia y la liberación de aminoácidos excitatorios como aspartato y glutamato al espacio extracelular (Sandberg et al., 1986; Camacho et al., 2006).

En la Figura 7 se presenta el efecto de la α-mangostina sobre la viabilidad celular en NGC tratadas con IAA, la cual se determinó 24 h después del tratamiento con el tóxico. Se puede observar que el 100% de viabilidad se define cuando las NGC no tienen ningún tratamiento. Cuando se incuban con una concentración de 18 μM de IAA en ausencia de α-mangostina se reduce la viabilidad aproximadamente un 55%. Cuando las NGC se preincuban con α-mangostina antes de la adición del IAA, se previene la muerte celular

de manera dependiente de la concentración siendo diferente significativamente a la concentración 14  $\mu\text{M}$ .

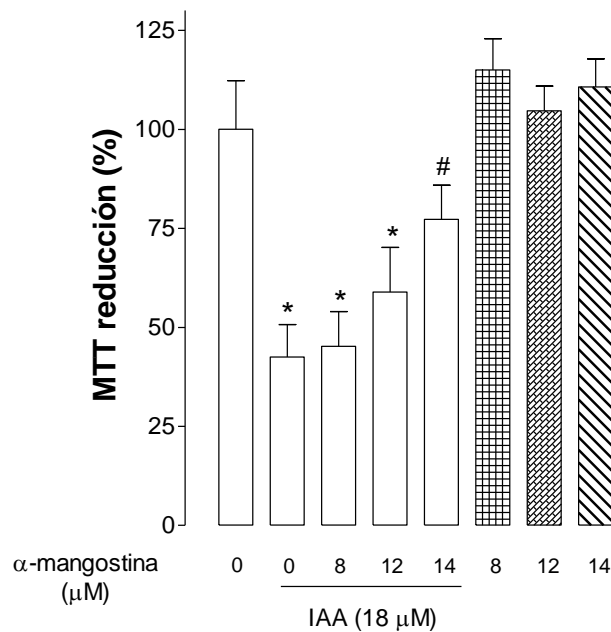


Figura 7. Viabilidad celular de NGC preincubadas con  $\alpha$ -mangostina y tratadas con IAA en las condiciones descritas en la sección de Materiales y Métodos. Los resultados se presentan como promedio $\pm$ EEM. n=5. \*p<0.001 vs control, #p<0.001 vs IAA.

La protección celular a la concentración de 14  $\mu\text{M}$  de  $\alpha$ -mangostina puede deberse a la capacidad de esta xantona de atrapar las ERO que se producen por la adición del IAA a las células.

Por otra parte se sabe que el extracto del pericarpio y el jugo comercial de mangostán poseen capacidad antioxidante ya que atrapa ERO y ERN además de prevenir el daño neurotóxico a NGC de manera dosis-dependiente (Guzmán-Beltrán et al., 2008).

### 5.3 Evaluación de la producción de ERO

Se sabe que una alteración en el metabolismo representa eventos fisiopatológicos que conducen a estrés oxidante. La generación de ERO es un mecanismo que provoca el daño a las células en varias enfermedades neurodegenerativas (Márquez-Valadez et al., 2009), afectan la estructura y función de macromoléculas como lípidos de membrana, proteínas y ácidos nucleicos (Cárdenas-Rodríguez y Pedraza-Chaverri, 2006).

Se sabe, además que el IAA induce neurotoxicidad en NGC como un modelo asociado con la producción de ERO (Cárdenas-Rodríguez et al., 2009; González-Reyes et al., 2009).

Por otro lado Sánchez-Pérez y colaboradores (2010) determinaron que la  $\alpha$ -mangostina atenúa el aumento de la producción de ERO evitando la apoptosis de células del epitelio renal del túbulo proximal (LLC-PK1) además de inhibir la expresión de p53.

En este trabajo se midió la producción de ERO utilizando las sondas DHE y carboxi-H<sub>2</sub>DCFDA que al ser oxidadas por las ERO presentes en la muestra se convierten en los compuestos fluorescentes Et y carboxi-DCF. El DHE es relativamente específico para O<sub>2</sub><sup>•-</sup> y la carboxi-H<sub>2</sub>DCFDA es oxidada por diversas ERO como H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, OH<sup>•</sup>, ROO<sup>•</sup> (Gomes et al., 2005).

Las micrografías fluorescentes de la producción de ERO se obtuvieron 4 h después de tratar a las NGC con IAA, utilizando los marcadores fluorescentes antes mencionados (Figura 8).

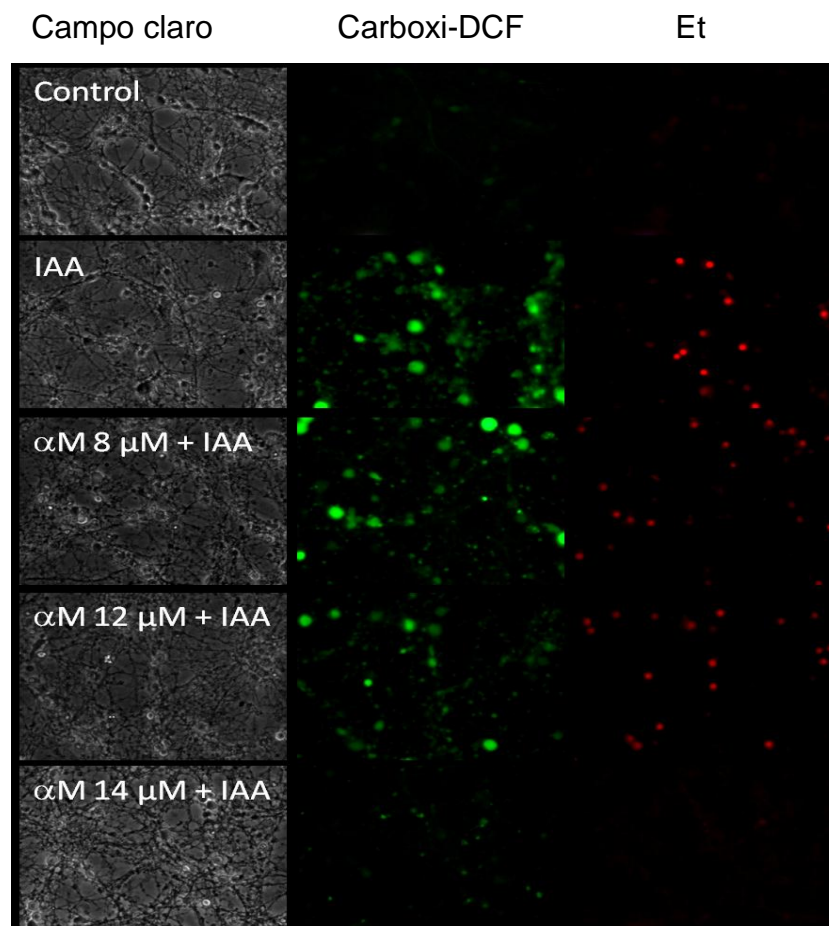


Figura 8. Micrografías fluorescentes de la producción de ERO utilizando DHE y carboxi-H<sub>2</sub>DCFDA.

En las micrografías se observa que el control presenta muy baja intensidad de fluorescencia lo que indica una producción muy baja de ERO. Cuando las NGC se trataron con IAA intensidad de fluorescencia aumentó marcadamente indicando una mayor producción de ERO. Cuando la NGC se preincubaron con diferentes concentraciones de  $\alpha$ -mangostina antes de la adición de IAA se observa claramente que la producción de ERO disminuye a la concentración de 14  $\mu$ M.

Estas observaciones sugieren que la generación de ERO puede asociarse con la inhibición metabólica que provoca el IAA y a la depleción de ATP, lo cual es efectivamente reducido por antioxidantes (Uto et al., 1995; Malcolm et al., 2000; Taylor et al., 1996).

En la Figura 9 se presentan los resultados de la cuantificación de ERO que se realizó de la manera descrita en la sección de métodos.

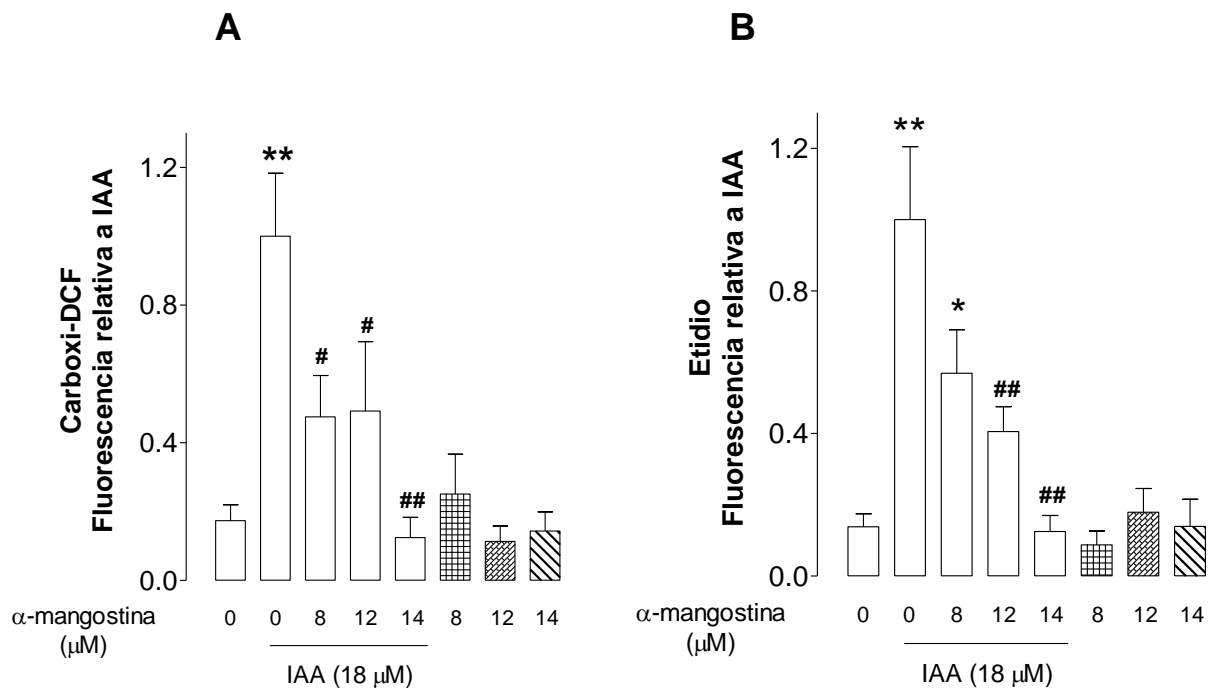


Figura 9. Determinación de la presencia de ERO en NGC preincubadas 16 h con  $\alpha$ -mangostina y después con IAA (18  $\mu$ M). En (A) la oxidación de la sonda carboxi- $H_2DCFDA$  y en (B) se observa la oxidación de la sonda DHE. Los datos están presentados como promedio  $\pm$  EEM.  $n=3$  en cada caso. \* $p<0.05$  y \*\* $p<0.01$  vs. control; # $p<0.05$  y ## $p<0.01$  vs IAA.

Se puede observar en la Figura 9 que el control presenta una producción de ERO muy baja. Cuando se realiza el tratamiento con IAA la fluorescencia aumenta

significativamente por la alta cantidad de ERO que se están produciendo. La preincubación con  $\alpha$ -mangostina a la concentración de 14  $\mu\text{M}$  disminuye significativamente la producción de ERO con ambos marcadores y con 12  $\mu\text{M}$  también disminuye significativamente la producción de ERO medida con DHE. De todo lo anterior se puede establecer que la  $\alpha$ -mangostina es capaz de prevenir el daño producido y el incremento en ERO inducidos por el IAA a las NGC.

## 6. Conclusión

La preincubación por 16 h con  $\alpha$ -mangostina previno la muerte celular de NGC tratadas con el neurotóxico IAA. Dicha protección se asoció a la atenuación de la producción de ERO.

## 7. Referencias

Balasubramanian K, Rajagopalan K, 1988. Xanthones from *Garcinia mangostana*, structures of BR-xanthone-A and BR-xanthone-B. *Phytochemistry* 27:1552-1554.

Berridge MV, Tan AS, 1993. Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 303:474-482.

Bindokas V, Jordan J, Lee C, Millar R, 1996. Superoxide production in rat hippocampal neurons: selective imaging with hydroethidine. *Journal of Neuroscience* 16:1324–1336.

Camacho A, Montiel T, Massieu L, 2006. The anion channel blocker, 4,4'-dinitrostilbene-2,2'-disulfonic acid prevents neuronal death and excitatory amino acid release during glycolysis inhibition in the hippocampus in vivo. *Neuroscience* 142:1005–1017.

Cárdenas-Rodríguez N, Pedraza-Chaverrí J, 2006. Sustancias reactivas de oxígeno y sistemas antioxidantes: aspectos básicos. *Educación Química* 17:164-173.



Cárdenas-Rodríguez N, Guzmán-Beltrán S, Medina-Campos ON, Orozco-Ibarra M, Massieu L, Pedraza-Chaverri J, 2009. The effect of nordihydroguaiaretic acid on iodoacetate-induced toxicity in cultured neurons. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology* 23:137-142.

Chopra R, Nayar S, Chopra I, 1956. Glossary of Indian medicinal plants. *The National Institute of Science Communication and Information resources*. Nueva Dehli. 123.

Eberhardt MK, 2001. Reactive Oxygen Metabolites; CRC Press. Department of pathology and Laboratory Medicine University of Puerto Rico; San Juan, Puerto Rico. Capítulo 3 y 8.

Fan C, Su J, 1997. Antioxidative mechanism of isolated components from methanol extract of fruit hulls of *G. Mangostana* L. *Journal of the Chinese Agricultural Chemical Society* 35:540–551.

Garnett M, Sturton S, 1932. *Garcinia. Mangostana* in the treatment of amoebic dysentery. *Chinese Medical Journal* 46:969-973.

Gomes A, Fernandes E, Lima J, 2005. Fluorescence probes used for detection of reactive oxygen species. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 65:45-80.

González-Reyes S, Orozco-Ibarra M, Guzmán-Beltrán S, Molina-Jijón E, Massieu L, Pedraza-Chaverri J, 2009. Neuroprotective role of heme-oxygenase 1 against iodoacetate-induced toxicity in rat cerebellar granule neurons: Role of bilirubin. *Free Radical Research* 43:214-223.

Gopalakrishnan C, Shankaranarayanan D, Kameswaran L, Nazimudeen S, 1980. Effect of mangostin, a xanthone from *Garcinia mangostana* Linn. In immunopathological and inflammatory reactions. *Indian Journal of Experimental Biology* 8:843-846.

Gopalakrishnan G, Banamathi B, Sresh G, 1997. Evaluation of the antifungal activity of natural xanthones from *Garcinia mangostana* and their synthetic derivatives. *Journal of Natural Products* 60:519-524.

Guzmán-Beltrán S, Orozco-Ibarra M, González-Cuahutencos O, Victoria-Mares S, Merchand-Reyes G, Medina-Campos ON, Pedraza-Chaverri J, 2008. Neuroprotective effect and reactive oxygen species scavenging capacity of mangosteen pericarp extract in cultured neurons. *Current Topics in Nutraceutical Research* 6:149-158.

Halliwell B, Gutteridge J, 1990. The antioxidants of human extracellular fluids. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 280:1-8.

Halliwell B, Gutteridge J, 2001. Free Radicals in Biology and Medicine. *Oxford University Press*, 3a edición. Capítulo 1 y 4.

Halliwell B, Gutteridge J, 2007. Free Radicals in Biology and Medicine. *Oxford University Press*, 4a edición. Capítulo 3.

Hernández-Fonseca K, Cárdenas-Rodríguez N, Pedraza-Chaverri J, Massieu L, 2008. Calcium-dependent production of ROS is involved in neuronal damage induced during glycolysis inhibition in cultured hippocampal neurons. *Journal of Neuroscience Research* 86:1768-1780.

Iinuma M, Tosa H, Tanaka T, Asai F, Kobayashi Y, Shimano R, Miyauchi K, 1996. Antibacterial activity of xanthenes from guttiferaceous plants against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 48:861-865.

Jung H, Su B-N, Keller W, Mehta R, Kinghorn A, 2006. Antioxidant xanthenes from the pericarp of *Garcinia mangostana* (Mangosteen). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54:2077-2082.

Mahabusarakam W, Proudfoot J, Taylor W, Coft K, 2000. Inhibition of lipoprotein oxidation by prenylated xanthenes derived from mangostin. *Free Radical Research* 33:643-659.

Mahabusarakam W, Wiriyaichitra P, Taylor W, 1987. Chemical constituents of *Garcinia mangostana*. *Journal of Natural Products* 50:474-478.

Malcolm C, Benwell K, Lamb H, Bebbington D, Porter R, 2000. Characterization of iodoacetate-mediated neurotoxicity in vitro using primary cultures of rat cerebellar granule cells. *Free Radical Biology and Medicine* 28:102–107.

Marcason W, 2006. What are the facts and myths about mangosteen? *Journal of the American Dietetic Association* 106:986.

Marquez-Valadez B, Lugo-Huitron R, Valdivia-Cerda V, Miranda-Ramirez LR, Perez-De La Cruz V, Gonzalez-Cuahutencos O, Rivero-Cruz I, Mata R, Santamaria A, Pedraza-Chaverri J, 2009. The natural xanthone alpha mangostin reduces oxidative damage in rat brain tissue. *Nutritional Neuroscience* 12:35–42.

Massieu L, Haces ML, Montiel T, Hernández-Fonseca K, 2003. Acetoacetate protects hippocampal neurons against glutamate-mediated neuronal damage during glycolysis inhibition. *Neuroscience* 120:365–378.

Matsumoto K, Akao Y, Kobayashi E, Ohguchi K, Ito T, Tanaka T, Iinuma M, Nozawa Y, 2003. Induction of apoptosis by xanthenes from mangosteen in human leukemia cell lines. *Journal of Natural Products* 66:1124-1127.

Moongkarndi P, Kosem N, Luanratana O, Jongsomboonkusol S, Pongpan N, 2004. Antiproliferative activity of Thai medicinal plant extracts on human breast adenocarcinoma cell line. *Fitoterapia* 75:375-377.

Moreira PI, Santos MS, Oliveira CR, Sheik JC, Nunomura A, Smith MA, Zhu X, Perry G, 2008. Alzheimer disease and the role of free radicals in the pathogenesis of the disease. *CNS & Neurological Disorders Drug Targets* 7:3-10.

Nolasco Amaya Eva Guadalupe, 2008. Propiedades antioxidantes de  $\alpha$ -mangostina. Tesis de Licenciatura de Química de Alimentos. Facultad de Química, UNAM.

Olinescu R, Smith T, 2002. Free Radicals in Medicine. *Nova Science Publishers, Inc.* Huntington, New York. Capítulo 1 y 7.

Orozco-Ibarra M, Estrada-Sánchez AM, Massieu L, Pedraza-Chaverrí J, 2008. Heme oxygenase-1 induction prevents neuronal damage triggered during mitochondrial inhibition: role of CO and bilirubin. *The International Journal Biochemistry and Cell Biology* 41:1304-1314.

Pedraza-Chaverrí J, Reyes-Fermín LM, Nolasco-Amaya EG, Orozco-Ibarra M, Medina-Campos ON, González-Cuahutencos O, Rivero-Cruz I, Mata R, 2009. ROS scavenging capacity and neuroprotective effect of  $\alpha$ -mangostin against 3-nitropropionic acid in cerebellar granule neurons. *Experimental and Toxicologic Pathology* 61:491–501.

Peres V, Nagem TJ, Faustino de Oliveira F, 2000. Tetraoxygenated naturally occurring xanones. *Phytochemistry* 55:683-710.

Pierce S, 2003. Thai herbal, Traditional recipes for health and harmony. *Findhorn Press. Scotland, Finland.* p.118.

Pinto M, Sousa M, Nascimento M, 2005. Xanthone derivatives: new insights in biological activities. *Current Medicinal Chemistry* 12:2517-2539.

Schapira AH. 2008. Mitochondria in the aetiology and pathogenesis of Parkinson's disease. *Lancet Neurology* 7:97-109.

Sánchez-Pérez Y, Morales-Bárcenas R, García-Cuellar CM, López-Marure R, Calderon-Oliver M, Pedraza-Chaverrí J, Chirino YI, 2010. The  $\alpha$ -mangostin prevention on cisplatin-induced apoptotic death in LLC-PK1 cells is associated to an inhibition of ROS production and p53 induction. *Chemico-Biological Interactions* 188: 144-150.

Sandberg M, Butcher SP, Hagberg H, 1986. Extracellular overflow of neuroactive amino acids during severe insulin-induced hypoglycemia: In vivo dialysis of the rat hippocampus. *Journal of Neurochemistry* 47:178–184.

Sen A, Uusvuori R, Hase T, Benerji N, Sarkar K, Mazumder P, 1980. A xanthone from *Garcinia mangostana*. *Phytochemistry* 19:2223-2225.

Shankaranarayan D, Gopalakrishnan C, Kameswaran L, 1979. Pharmacological profile of mangostin and its derivatives. *Archives Internationales de Pharmacodynamie et de Thérapie* 230:257-269.

Sperling O, Bromberg Y, Oelsner H, Zoref-Shani E, 2003. Reactive oxygen species play an important role in iodoacetate-induced neurotoxicity in primary rat neuronal cultures and in differentiated PC12 cells. *Neuroscience Letters* 351:137-140.

Sukit Y, Anusak S, Chatchai W, 2009. Validation of LC for the determination of  $\alpha$ -mangostin in mangosteen peel extract: A tool for quality assessment of *Garcinia mangostana* L. *Journal of Chromatographic Science* 47:185-189.

Suksamrarn S, Suwannapoo N, Phakhodee W, Thanuhiranlert J, Ratananukul P, Chimnoi N, Suksamrarn A, 2003. Antimycobacterial activity of prenylated xanthenes from the fruits of *Garcinia mangostana*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 51:857-859.

Taylor BM, Fleming WE, Benjamin CW, Wu Y, Mathews WR, Sun FF, 1996. The mechanism of cytoprotective action of lazaroids I: Inhibition of reactive oxygen species formation and lethal cell injury during periods of energy depletion. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 29:1224-1231.

Uto A, Dux E, Kusumoto M, Hossmann KA, 1995. Delayed neuronal death after brief histotoxic hypoxia in vitro. *Journal of Neurochemistry* 64:2185–2192.

Vieira L, Kijjoa A, 2005. Naturally-occurring xanthenes: recent developments. *Current Medicinal Chemistry* 12:2413-1446.

Williams P, Ongsakul M, Proudfoot J, Croft K, Beilin L, 1995. Mangostin inhibits the oxidative modification of human low density lipoprotein. *Free Radical Research* 23:175-184.

Yukihiro A, Yoshihito N, Munekazu I, Yoshinori N. Anti-cancer effects of xanthenes from pericarps of mangosteen; 2008. Anti-cancer effects of xanthenes from pericarps of mangostan. *International Journal of Molecular Sciences* 9:355-370.